

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-153279

(P2002-153279A)

(43)公開日 平成14年5月28日 (2002.5.28)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

C 12 N 15/09  
C 07 K 5/062  
5/083  
7/06  
14/435

識別記号

ZNA

F I

C 07 K 5/062  
5/083  
7/06  
14/435  
14/47

テ-マ-ト<sup>\*</sup>(参考)

2 G 0 5 4  
4 B 0 2 4  
4 B 0 6 4  
4 H 0 4 5

審査請求 有 請求項の数15 O L (全 25 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号

特願2000-356047(P2000-356047)

(22)出願日

平成12年11月22日 (2000.11.22)

(71)出願人 391012718

岡崎国立共同研究機構長  
愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38番地

(72)発明者 中井 淳一

愛知県岡崎市竜美南2丁目4番地1 竜美  
ヶ丘公務員宿舎2号棟52号

(74)代理人 100058479

弁理士 鈴江 武彦 (外5名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 緑色蛍光蛋白質の蛍光特性を制御することが可能なバイオセンサー蛋白質の作成方法、および前記方法により作成されるバイオセンサー蛋白質

(57)【要約】

【課題】 緑色蛍光蛋白質の蛍光特性を制御することが可能なバイオセンサー蛋白質を作成する方法を提供すること、並びに前記方法により作成されるバイオセンサー蛋白質を提供すること。

【解決手段】 (1) 蛍光特性に影響を及ぼすホットスポットアミノ酸残基の近傍で緑色蛍光蛋白質のアミノ酸配列を切断して、前記蛋白質の構造を改変した改変緑色蛍光蛋白質、および(2)自身の立体構造の変化を前記改変緑色蛍光蛋白質に伝えることにより、前記改変緑色蛍光蛋白質の立体構造を変化させ、蛍光特性を変化させるように機能する機能性分子を含むことを特徴とするバイオセンサー蛋白質。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 緑色蛍光蛋白質の構造を改変することにより、緑色蛍光蛋白質の蛍光特性を制御することが可能なバイオセンサー蛋白質を作成する方法であって、  
(A) 緑色蛍光蛋白質の蛍光特性に影響を及ぼすホットスポットアミノ酸残基を推定する工程と；  
(B) 前記ホットスポットアミノ酸残基の近傍で緑色蛍光蛋白質のアミノ酸配列を切断して前記蛋白質の構造を改変した種々の改変緑色蛍光蛋白質と、自身の立体構造の変化を前記改変緑色蛍光蛋白質に伝えることにより、前記改変緑色蛍光蛋白質の立体構造を変化させ、蛍光特性を変化させるように機能する機能性分子とが連結された種々の融合蛋白質を作成する工程と；  
(C) 前記種々の融合蛋白質に、前記機能性分子の立体構造に影響を及ぼす因子を作用させる工程と；  
(D) 前記種々の融合蛋白質のなかから、前記(C)工程により蛍光特性に変化が現れる融合蛋白質をバイオセンサー蛋白質として選択する工程とを具備することを特徴とする方法。  
【請求項2】 請求項1に記載の方法であって、前記蛍光特性が蛍光強度であることを特徴とする方法。  
【請求項3】 (1) 蛍光特性に影響を及ぼすホットスポットアミノ酸残基の近傍で緑色蛍光蛋白質のアミノ酸配列を切断して、前記蛋白質の構造を改変した改変緑色蛍光蛋白質、および  
(2) 自身の立体構造の変化を前記改変緑色蛍光蛋白質に伝えることにより、前記改変緑色蛍光蛋白質の立体構造を変化させ、蛍光特性を変化させるように機能する機能性分子を含むことを特徴とするバイオセンサー蛋白質。  
【請求項4】 請求項3に記載のバイオセンサー蛋白質であって、前記蛍光特性が蛍光強度であることを特徴とする蛋白質。  
【請求項5】 請求項3または4に記載のバイオセンサー蛋白質であって、前記ホットスポットアミノ酸残基が、緑色蛍光蛋白質の第148番目であることを特徴とするバイオセンサー蛋白質。  
【請求項6】 請求項3または4に記載のバイオセンサー蛋白質であって、前記ホットスポットアミノ酸残基が、緑色蛍光蛋白質の第94番目であることを特徴とするバイオセンサー蛋白質。  
【請求項7】 請求項3または4に記載のバイオセンサー蛋白質であって、前記ホットスポットアミノ酸残基が、緑色蛍光蛋白質の第96番目であることを特徴とするバイオセンサー蛋白質。  
【請求項8】 請求項3または4に記載のバイオセンサー蛋白質であって、前記ホットスポットアミノ酸残基が、緑色蛍光蛋白質の第222番目であることを特徴とするバイオセンサー蛋白質。  
【請求項9】 (1) 下記(a)、(b)のアミノ酸配

列を、N末端から順に有する改変緑色蛍光蛋白質：

(a) 緑色蛍光蛋白質のX～238番目のアミノ酸配列、  
(b) 緑色蛍光蛋白質の1～Y番目のアミノ酸配列、(ここで、Xは148～150の任意の位置であり、Yは140～147の任意の位置である)、および  
(2) 自身の立体構造の変化を前記改変緑色蛍光蛋白質に伝えることにより、前記改変緑色蛍光蛋白質の立体構造を変化させ、蛍光特性を変化させるように機能する機能性分子を含むことを特徴とするバイオセンサー蛋白質。

【請求項10】 下記(a)～(h)の配列を、N末端から順に有することを特徴とするバイオセンサー蛋白質：

(a) メチオニンを含むアミノ酸配列(リンカーX)；  
(b) ミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質もしくはその一部のアミノ酸配列；  
(c) 前述の(b)の配列と後述の(d)の配列とを連結するアミノ酸配列(リンカーY)；  
(d) 緑色蛍光蛋白質のX～238番目のアミノ酸配列(ここで、Xは148～150の任意の位置である)；  
(e) 前述の(d)の配列と後述の(f)の配列とを連結するアミノ酸配列；  
(f) 緑色蛍光蛋白質の1～Y番目のアミノ酸配列(ここで、Yは140～147の任意の位置である)；  
(g) 前述の(f)の配列と後述の(h)の配列とを連結するアミノ酸配列(リンカーZ)；  
(h) カルモジュリン蛋白質もしくはその一部のアミノ酸配列。

【請求項11】 (1) 下記(a)、(b)のアミノ酸配列を、N末端から順に有する改変緑色蛍光蛋白質：

(a) 緑色蛍光蛋白質の149～238番目のアミノ酸配列、  
(b) 緑色蛍光蛋白質の1～144番目のアミノ酸配列、および  
(2) 自身の立体構造の変化を前記改変緑色蛍光蛋白質に伝えることにより、前記改変緑色蛍光蛋白質の立体構造を変化させ、蛍光特性を変化させるように機能する機能性分子を含むことを特徴とするバイオセンサー蛋白質。

【請求項12】 下記(a)～(h)の配列を、N末端から順に有することを特徴とするバイオセンサー蛋白質：

(a) メチオニンを含むアミノ酸配列(リンカーX)；  
(b) ミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質もしくはその一部のアミノ酸配列；  
(c) 前述の(b)の配列と後述の(d)の配列とを連結するアミノ酸配列(リンカーY)；  
(d) 緑色蛍光蛋白質の149～238番目のアミノ酸配

列；

- (e) 前述の(d)の配列と後述の(f)の配列とを連結するアミノ酸配列；
- (f) 緑色蛍光蛋白質の1～144番目のアミノ酸配列；
- (g) 前述の(f)の配列と後述の(h)の配列とを連結するアミノ酸配列(リンカーZ)；および
- (h) カルモジュリン蛋白質もしくはその一部のアミノ酸配列。

【請求項13】 請求項3～9、11の何れか1項に記載のバイオセンサー蛋白質であって、前記機能性分子が、カルモジュリン蛋白質もしくはその一部のアミノ酸配列、およびミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質もしくはその一部のアミノ酸配列であることを特徴とするバイオセンサー蛋白質。

【請求項14】 下記(a)～(h)の配列を、N末端から順に有することを特徴とするバイオセンサー蛋白質：

- (a) Met-Gly-ThrまたはMet-Val-Asp(リンカーニュ)；
- (b) ミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質の一部のアミノ酸配列(Ser-Ser-Arg-Arg-Lys-Trp-Asp-Lys-Thr-Gly-His-Ala-Val-Arg-Ala-Ile-Gly-Arg-Leu-Ser-Ser)；
- (c) Leu-Glu(リンカーニュ)；
- (d) 緑色蛍光蛋白質の149～238番目のアミノ酸配列；
- (e) Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Ser(連結アミノ酸配列)；
- (f) 緑色蛍光蛋白質の1～144番目のアミノ酸配列；
- (g) Gly-Thr-ArgまたはThr-Arg(リンカーニュ)；および
- (h) ラットのカルモジュリン蛋白質の2～148番目のアミノ酸配列。

【請求項15】 請求項3～14の何れか1項に記載のバイオセンサー蛋白質をコードするバイオセンサー遺伝子。

【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、緑色蛍光蛋白質の蛍光特性を制御することが可能なバイオセンサー蛋白質を作成する方法に関する。更に本発明は、前記方法により作成されるバイオセンサー蛋白質、および前記バイオセンサー蛋白質をコードするバイオセンサー遺伝子に関する。

#### 【0002】

【従来の技術】現在までに、緑色蛍光蛋白質(Green Fluorescent Protein; 以下、GFPともいう)を用いて蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を応用したバイオセンサーがいくつか開発されている。近年FRETを使わず

に一種類のGFPで蛍光強度を変化させるタイプの新しいバイオセンサーの開発報告がなされている。しかし、バイオセンサーの感受性は非常に低いものであり、とても実用的なものではなかった。このようなバイオセンサーの感受性の問題は、用いた機能性蛋白質とGFPとの結合部位の検討が不十分であったためであることを、本発明者は本発明を為すにあたり新たに見出した。

【0003】一方、バイオセンサーのうちカルシウムセンサーに関しては、これまでに大きく分けて4種類のカルシウムセンサーが開発されている。以下にその概要と問題点を示す。

【0004】1) カルシウム感受性の合成色素：これは、カルシウムに感受性のある化学合成された色素で、現在一般によく使用されている。色素を外部から細胞に取り込ませて使用するものである。特定の細胞のみに色素を取り込ませることは難しく、その場合にはガラス針等により細胞に色素を注入しなければならないという問題点を有する。

【0005】2) エクオリン：これは、カルシウムに反応して光を発する蛋白質である。細胞に直接注入するか、エクオリンを产生する遺伝子を細胞に取り込ませて使用する。エクオリンが機能するためには細胞に補酵素を供給する必要があり、また発する光が極めて弱いという問題点を有する。

【0006】3) FRETを応用したカルシウム感受性蛋白質：これは、カルシウムに感受性のあるカルモジュリン(CaM)とそれに結合するミオシン軽鎖キナーゼの一部の配列、二つの色の異なるGFPを結合した蛋白質である。当該蛋白質は、カルシウムがCaMに結合するとその構造が変化し、FRETを起こして二つのGFPの発する蛍光の強度が変化することを利用したものである。当該蛋白質は、細胞に直接注入するか、その遺伝子を細胞に取り込ませて使用する。FRETによる蛍光の変化は小さいためその信号は極めて弱く、更に一般的に用いられているアルゴンレーザーを搭載したレーザー顕微鏡で測定することができないという問題点を有する。

【0007】4) 一つのGFPから成るカルシウム感受性蛋白：これは、GFPのアミノ酸配列の144番と146番の間にCaMを結合したカルシウム感受性蛋白質である。カルシウムがCaMに結合すると蛋白質の構造が変化し、GFPの発する蛍光の強度が変化することを利用している。当該蛋白質も、細胞に直接注入するか、その遺伝子を細胞に取り込ませて使用する。カルシウムに対する感度が低いため実際の細胞では信号/雑音比が悪くなり測定が困難であるという問題点を有する。

#### 【0008】

【発明が解決しようとする課題】上記事情に鑑み、本発明の目的は、緑色蛍光蛋白質の蛍光特性を制御することが可能なバイオセンサー蛋白質を作成する方法を提供す

ること、並びに前記方法により作成されるバイオセンサー蛋白質、および前記バイオセンサー蛋白質をコードするバイオセンサー遺伝子を提供することである。

【0009】より具体的には、検出すべき物質に対する感度が実用に耐える程度に充分高く、且つ測定が容易なバイオセンサー蛋白質を作成することを目的とする。また、特定細胞への取り込みが容易であり、更に、測定に特別な装置および補酵素等を必要としないバイオセンサー蛋白質を作成することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するため、本発明は以下に記載の手段【1】～【15】を提供する。

【0011】【1】 緑色蛍光蛋白質の構造を改変することにより、緑色蛍光蛋白質の蛍光特性を制御することが可能なバイオセンサー蛋白質を作成する方法であつて、

(A) 緑色蛍光蛋白質の蛍光特性に影響を及ぼすホットスポットアミノ酸残基を推定する工程と；

(B) 前記ホットスポットアミノ酸残基の近傍で緑色蛍光蛋白質のアミノ酸配列を切断して前記蛋白質の構造を改変した種々の改変緑色蛍光蛋白質と、自身の立体構造の変化を前記改変緑色蛍光蛋白質に伝えることにより、前記改変緑色蛍光蛋白質の立体構造を変化させ、蛍光特性を変化させるように機能する機能性分子とが連結された種々の融合蛋白質を作成する工程と；

(C) 前記種々の融合蛋白質に、前記機能性分子の立体構造に影響を及ぼす因子を作用させる工程と；

(D) 前記種々の融合蛋白質のなかから、前記(C)工程により蛍光特性に変化が現れる融合蛋白質をバイオセンサー蛋白質として選択する工程とを具備することを特徴とする方法。

【0012】【2】 【1】に記載の方法であって、前記蛍光特性が蛍光強度であることを特徴とする方法。

【0013】【3】 (1) 蛍光特性に影響を及ぼすホットスポットアミノ酸残基の近傍で緑色蛍光蛋白質のアミノ酸配列を切断して、前記蛋白質の構造を改変した改変緑色蛍光蛋白質、および

(2) 自身の立体構造の変化を前記改変緑色蛍光蛋白質に伝えることにより、前記改変緑色蛍光蛋白質の立体構造を変化させ、蛍光特性を変化させるように機能する機能性分子を含むことを特徴とするバイオセンサー蛋白質。

【0014】【4】 【3】に記載のバイオセンサー蛋白質であって、前記蛍光特性が蛍光強度であることを特徴とする蛋白質。

【0015】【5】 【3】または【4】に記載のバイオセンサー蛋白質であって、前記ホットスポットアミノ酸残基が、緑色蛍光蛋白質の第148番目であることを特徴とするバイオセンサー蛋白質。

【0016】【6】 【3】または【4】に記載のバイオセンサー蛋白質であって、前記ホットスポットアミノ酸残基が、緑色蛍光蛋白質の第94番目であることを特徴とするバイオセンサー蛋白質。

【0017】【7】 【3】または【4】に記載のバイオセンサー蛋白質であって、前記ホットスポットアミノ酸残基が、緑色蛍光蛋白質の第96番目であることを特徴とするバイオセンサー蛋白質。

【0018】【8】 【3】または【4】に記載のバイオセンサー蛋白質であって、前記ホットスポットアミノ酸残基が、緑色蛍光蛋白質の第222番目であることを特徴とするバイオセンサー蛋白質。

【0019】【9】 (1) 下記(a)、(b)のアミノ酸配列を、N末端から順に有する改変緑色蛍光蛋白質：

(a) 緑色蛍光蛋白質のX～238番目のアミノ酸配列、

(b) 緑色蛍光蛋白質の1～Y番目のアミノ酸配列、(ここで、Xは148～150の任意の位置であり、Yは140～147の任意の位置である)、および

(2) 自身の立体構造の変化を前記改変緑色蛍光蛋白質に伝えることにより、前記改変緑色蛍光蛋白質の立体構造を変化させ、蛍光特性を変化させるように機能する機能性分子を含むことを特徴とするバイオセンサー蛋白質。

【0020】【10】 下記(a)～(h)の配列を、N末端から順に有することを特徴とするバイオセンサー蛋白質：

(a) メチオニンを含むアミノ酸配列(リンカーX)；

(b) ミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質もしくはその一部のアミノ酸配列；

(c) 前述の(b)の配列と後述の(d)の配列とを連結するアミノ酸配列(リンカーY)；

(d) 緑色蛍光蛋白質のX～238番目のアミノ酸配列(ここで、Xは148～150の任意の位置である)；

(e) 前述の(d)の配列と後述の(f)の配列とを連結するアミノ酸配列；

(f) 緑色蛍光蛋白質の1～Y番目のアミノ酸配列(ここで、Yは140～147の任意の位置である)；

(g) 前述の(f)の配列と後述の(h)の配列とを連結するアミノ酸配列(リンカーZ)；

(h) カルモジュリン蛋白質もしくはその一部のアミノ酸配列。

【0021】【11】 (1) 下記(a)、(b)のアミノ酸配列を、N末端から順に有する改変緑色蛍光蛋白質：

(a) 緑色蛍光蛋白質の149～238番目のアミノ酸配列、

(b) 緑色蛍光蛋白質の1～144番目のアミノ酸配列、および

(2) 自身の立体構造の変化を前記改変緑色蛍光蛋白質に伝えることにより、前記改変緑色蛍光蛋白質の立体構造を変化させ、蛍光特性を変化させるように機能する機能性分子を含むことを特徴とするバイオセンサー蛋白質。

【0022】[12] 下記(a)～(h)の配列を、N末端から順に有することを特徴とするバイオセンサー蛋白質：

- (a) メチオニンを含むアミノ酸配列(リンカーX)；
- (b) ミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質もしくはその一部のアミノ酸配列；
- (c) 前述の(b)の配列と後述の(d)の配列とを連結するアミノ酸配列(リンカーY)；
- (d) 緑色蛍光蛋白質の149～238番目のアミノ酸配列；
- (e) 前述の(d)の配列と後述の(f)の配列とを連結するアミノ酸配列；
- (f) 緑色蛍光蛋白質の1～144番目のアミノ酸配列；
- (g) 前述の(f)の配列と後述の(h)の配列とを連結するアミノ酸配列(リンカーZ)；および
- (h) カルモジュリン蛋白質もしくはその一部のアミノ酸配列。

【0023】[13] [3]～[9]、[11]の何れか1に記載のバイオセンサー蛋白質であって、前記機能性分子が、カルモジュリン蛋白質もしくはその一部のアミノ酸配列、およびミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質もしくはその一部のアミノ酸配列であることを特徴とするバイオセンサー蛋白質。

【0024】[14] 下記(a)～(h)の配列を、N末端から順に有することを特徴とするバイオセンサー蛋白質：

- (a) Met-Gly-ThrまたはMet-Val-Asp(リンカーX)；
- (b) ミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質の一部のアミノ酸配列(Ser-Ser-Arg-Arg-Lys-Trp-Asp-Lys-Thr-Gly-His-Ala-Val-Arg-Ala-Ile-Gly-Arg-Leu-Ser-Ser)；
- (c) Leu-Glu(リンカーY)；
- (d) 緑色蛍光蛋白質の149～238番目のアミノ酸配列；
- (e) Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Ser(連結アミノ酸配列)；
- (f) 緑色蛍光蛋白質の1～144番目のアミノ酸配列；
- (g) Gly-Thr-ArgまたはThr-Arg(リンカーZ)；および
- (h) ラットのカルモジュリン蛋白質の2～148番目のアミノ酸配列。

【0025】[15] [3]～[14]の何れか1に

記載のバイオセンサー蛋白質をコードするバイオセンサー遺伝子。

【0026】

【発明の実施の形態】以下、本発明の緑色蛍光蛋白質の蛍光特性を制御することが可能なバイオセンサー蛋白質の作成方法について(A)～(E)の工程順に説明する。本発明のバイオセンサー蛋白質は、一分子の緑色蛍光蛋白質から成るものである。

【0027】〈本発明のバイオセンサー蛋白質の作成方法〉

(A) 緑色蛍光蛋白質の蛍光特性に影響を及ぼすホットスポットアミノ酸残基を推定する工程：緑色蛍光蛋白質(以下、GFPともいう)は、238個のアミノ酸からなる蛋白質である。本発明で使用したGFPは、Clontech社から入手した組換えGFP(EGFP)である。EGFPは、本来のGFPには存在しないバリン(gtg)がN末のメチオニンにつづいて挿入されており、これはアミノ酸番号1' と呼ばれる。便宜的にアミノ酸番号1' のバリン(gtg)を省略したEGFPの核酸およびアミノ酸配列を配列番号1に示す。配列番号1に記載のアミノ酸配列における1～238番のアミノ酸は、本明細書に記載される「緑色蛍光蛋白質の第n番目のアミノ酸」に対応するものである。

【0028】本発明において実際に作成されたバイオセンサー蛋白質はすべて、N末のメチオニンの後にアミノ酸番号1' のバリンが挿入された上述のEGFPを使用して作成されたものである。

【0029】また本発明では便宜的に、GFPを図1Aに示すような簡略化した構造で示す。GFPは、その分子構造の内部中央に発色団を有している。GFPは、GFPをコードするcDNAを含むプラスミド、例えばpEGFP-N1(Clontech社)を発現させることにより入手することができる。

【0030】本発明において、GFPの蛍光特性に影響を及ぼす「ホットスポットアミノ酸残基」とは、後述の改変緑色蛍光蛋白質を作成する際に、その改変位置の指標となるGFP上のアミノ酸残基であり、このホットスポットアミノ酸残基の近傍でGFPの構造を改変することにより、所望の改変緑色蛍光蛋白質を作成することが可能となるものである。

【0031】GFPの構造を改変するとは、好ましくは、推定されるホットスポットアミノ酸残基の近傍(好ましくは、ホットスポットアミノ酸残基の前後5アミノ酸の範囲内の各位置)でGFPを切断し、更に切断部位から適切な数のアミノ酸(好ましくは1～10個のアミノ酸)を除去することをいう。ただし、GFPの構造改変は、所望の改変緑色蛍光蛋白質を作成することが可能であれば、記載された改変に限定されず、任意の改変を含み得る。

【0032】また、所望の改変緑色蛍光蛋白質(以下、

改変GFPともいう)とは、後述するとおり、GFPの構造を、その蛍光特性が可逆的に変化し得るように改変したものである。蛍光特性が可逆的に変化するとは、改変GFPの有している立体構造を変化させる因子(即ち、バイオセンサーが感知する因子)の有無により、改変GFPの立体構造が可逆的に変化し、それに伴って改変GFPの蛍光特性が可逆的に変化することをいう。この変化は、蛍光顕微鏡もしくはレーザー顕微鏡等で捉えることができる程度の変化をいい、好ましくは肉眼で捉えることができる程度の変化をいう。例えば、蛍光特性の変化が蛍光強度の変化である場合、蛍光の変化量 $\Delta F/F$ が、好ましくは、少なくとも0.1以上変化すること、より好ましくは1~10の範囲で変化することをいう。

【0033】本発明において蛍光特性とは、蛍光強度、蛍光波長、蛍光強度比、吸光度、吸光波長などの蛍光特性を指す。本発明では蛍光特性の一例として、蛍光強度を使用する。

【0034】このようなホットスポットアミノ酸残基という概念は、本発明において種々の改変GFPを有する種々のバイオセンサー蛋白質を試作したところ、GFPの蛍光特性に強い影響を与えるアミノ酸残基がGFP上に存在することを見出したことにより得られた概念である。

【0035】このようなホットスポットアミノ酸残基は、種々の改変GFPを有するバイオセンサー蛋白質を試作することにより、その性能からその位置を推定することもできるが、GFPの結晶構造を見て推定することもできる。即ち、ホットスポットアミノ酸残基は、GFPの発色団と水素結合をしているアミノ酸である可能性が高いので、GFPの結晶構造から発色団と水素結合をしているアミノ酸をホットスポットアミノ酸残基と推定することができる。

【0036】本発明において推定されたGFPのホットスポットアミノ酸残基は、GFPの第94番目、第96番目、第148番目、第222番目のアミノ酸である。これらの位置のアミノ酸残基がホットスポットアミノ酸残基として好ましいが、これらに限定されない。

【0037】(B)前記ホットスポットアミノ酸残基の近傍で緑色蛍光蛋白質のアミノ酸配列を切断して前記蛋白質の構造を改変した種々の改変緑色蛍光蛋白質と、自身の立体構造の変化を前記改変緑色蛍光蛋白質に伝えることにより、前記改変緑色蛍光蛋白質の立体構造を変化させ、蛍光特性を変化させるように機能する機能性分子とが連結された種々の融合蛋白質を作成する工程:前記工程(A)により推定されたホットスポットアミノ酸残基が、GFPのn番目のアミノ酸であると想定して以下説明する。

【0038】本発明において改変緑色蛍光蛋白質(以下、改変GFPともいう)とは、好ましくは、GFPを

ホットスポットアミノ酸残基の近傍(例えば、GFPのn番目のアミノ酸と(n+1)番目のアミノ酸との間)で切断し、次いで、切断部位のアミノ酸(例えば、(n-a)番目~n番目のアミノ酸)を除去することによりGFPの分子構造を改変し、必要に応じてGFPの本来のN末端と本来のC末端とを適切な連結アミノ酸(例えば、Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Ser)で連結したものをいう(図1C参照)。

【0039】ただし、このような連結アミノ酸を用いてGFP本来のN末端と本来のC末端とを連結し、一本の鎖で繋がれた蛋白質としなくとも、細胞内で分断されたままの2つのGFP断片が機能することも考えられる。

【0040】なお、GFPの本来のN末端とC末端とを連結するアミノ酸は、好ましくはアミノ酸2~10分子から成る配列であり、グリシンを多く含むアミノ酸が好ましく、特に好ましい例としては、Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Serが挙げられるがこれらに限定されない。

【0041】例えば、GFPをn番目のアミノ酸と(n+1)番目のアミノ酸との間で切断し、次いで、(n-a)番目~n番目のアミノ酸を除去し、本来のN末端とC末端とを上述の連結アミノ酸で連結させた場合、改変GFPは、N末端から順に、(n+1)番目~238番目のアミノ酸、連結アミノ酸、1番目~(n-a)番目のアミノ酸を有する蛋白質となる。尚この場合、後の工程において、改変GFPの新たなN末端および/またはC末端に機能性分子を連結させることになる(図1D参照)。

【0042】あるいは、GFPをn番目のアミノ酸と(n+1)番目のアミノ酸との間で切断し、次いで、(n-a)番目~n番目のアミノ酸を除去し、本来のN末端とC末端とを連結させない場合については、改変GFPは、1番目~(n-a)番目のアミノ酸と(n+1)番目~238番目のアミノ酸とに分断された蛋白質となる。この場合、後の工程で、分断されている両蛋白質の間に機能性分子を挟んで連結させることにより一本の鎖で繋がれた蛋白質としてもよい(図1B参照)。また、このように一本の鎖で繋がれた蛋白質としなくとも、細胞内で分断されたまま2つのGFP断片が機能することも考えられる。

【0043】なお、ここでGFPを切断するホットスポットアミノ酸残基(n番目のアミノ酸)の近傍とは、例えば、(n+5)~(n-5)の範囲、好ましくは(n+2)~(n-2)の範囲をいう。また、除去するアミノ酸、即ちaの値は、例えば1~10、好ましくはa=4である。

【0044】上述の範囲の種々の改変GFPを、バイオセンサー蛋白質を構成する候補として挙げることができる。ただし、上述のホットスポットアミノ酸残基の近傍の切断位置、および除去するアミノ酸の数は、当業者により適宜設定することができる。例えば、表1~2に記

載されるとおり、切断位置、除去するアミノ酸の数を種々、変更することができる。

【0045】(B) 工程において、前記変更GFPに連結される機能性分子とは、機能性分子自身が、機能性分子に作用する因子(即ち、バイオセンサーが感知する因子)の結合等の作用により、立体構造に変化を起こし得る分子であって、自身の立体構造の変化を変更GFPに伝え得る分子であれば限定されない。

【0046】従って、本発明において機能性分子は、自身の立体構造の変化を変更GFPに伝達し変更GFPの構造に変化を及ぼし得る位置で、変更GFPに連結されている必要がある。従って機能性分子は、本来のGFP構造を変更した部分に近接して連結されていることが好ましい。具体的には、GFPを切断した位置にリンカー分子を介して連結されていることが好ましい。

【0047】このような機能性分子は、一分子であってもよいし、二分子以上であってもよい。二分子の場合、機能性分子に作用する因子(即ち、バイオセンサーが感知する因子)は、まず一方の機能性分子の立体構造に変化を及ぼし、次いでその立体構造の変化が、他方の機能性分子の立体構造に変化を及ぼし、それぞれの機能性分子の構造変化が変更GFPの立体構造に変化を起こさせる。二分子以上の場合も同様に、最初の因子の作用を、シグナル伝達のように次々と他の機能性分子に伝えることにより、最終的には、全ての機能性分子の構造変化がそれぞれに作用して変更GFPの立体構造に変化を起こさせる。

【0048】このように機能性分子が二分子以上の場合には、それぞれの分子の構造変化が変更GFPの構造に影響を与えるため、機能性分子が一分子である場合より、変更GFPへの作用が大きく、結果的に、変更GFPの蛍光特性を大きく変化させることにつながり得る可能性が高い。

【0049】また、本発明において変更GFPに連結する機能性分子は、その機能性分子が生体内で発現しているとおりの全構造を有している必要は必ずしもなく、上述の機能性分子として役割を果たすものであれば、機能性分子に作用する因子が結合する部位のみを有している一部構造であってもよい。

【0050】機能性分子としては、例えば、カルモジュリン蛋白質とミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質との組み合わせ、またはCRE(Cyclic AMP Responsive Element)結合蛋白質(CREB)とCREB結合蛋白質(CBP)との組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0051】例えば、本発明では後述の実施例において、カルモジュリン蛋白質、およびミオシン軽鎖キナーゼのカルモジュリン結合機能を有する一部(即ち、M13断片)を機能性分子として使用した。このような機能性分子を変更GFPに連結すれば、この融合蛋白質はカルシウムセンサーとして機能し得る。

【0052】変更GFPに、カルモジュリン蛋白質(CaM)およびミオシン軽鎖キナーゼ(M13)の機能性分子を連結した融合蛋白質の構造を、図1Bおよび図1Dに模式的に示す。また、これら融合蛋白質の一例の構造を一次元的に図2に示す。

【0053】図2に示すように、変更GFPと機能性分子とは、数個のアミノ酸から成るリンカー分子により連結される。各リンカー分子を区別するため、融合蛋白質のN末端に存在する開始コドン(Met)を含むリンカーは、リンカーX; 変更GFPのN末端側と機能性分子(M13)を連結するリンカーは、リンカーY; 変更GFPのC末端側と機能性分子(CaM)とを連結するリンカーは、リンカーZと称する。なお、GFP本来のN末端とC末端とを繋ぐ連結アミノ酸(GGTGGS)については、変更GFPの説明の中の記載を参照されたい。

【0054】これら各リンカーの長さや配列は限定される必要はないが、その長さは0~10個が好ましく、2個がより好ましい。また、リンカーYの配列については、ロイシン-グルタミン酸が好ましい。

【0055】リンカーは、機能性分子の立体構造の変化を変更GFPに伝達する部分であるので、リンカーの長さや配列により変更GFPへの立体構造の変化の度合は大きく影響される。各リンカーの長さ、配列の選択は、結合する機能性分子により変えなければならない。リンカーナしで直接、変更GFPと機能性分子とが連結した場合も想定される。

【0056】実際には、リンカーの配列を種々変更させたバイオセンサー蛋白質を作成して実験してみる必要がある。

【0057】具体的に本発明においては、変更GFPと機能性分子(M13)とを連結するリンカーYの配列を種々変更させたバイオセンサー蛋白質を作成し、その反応性を調べている(表1~表4参照)。尚、ここでは、変更GFPのN末が本来のGFPの149番目のアミノ酸から始まるとき、この変更GFPのN末に隣接するリンカーYのアミノ酸を「GFPの148番目に相当するアミノ酸」と考える。また、「GFPの148番目に相当するアミノ酸」からN末側に1個遡ったアミノ酸を「GFPの147番目に相当するアミノ酸」と考える。同様に、変更GFPのN末が、本来のGFPの150番目のアミノ酸から始まるときには、この変更GFPのN末に隣接するリンカーYのアミノ酸からN末側に2個遡ったアミノ酸を「GFPの148番目に相当するアミノ酸」と考えることができる。

【0058】後述の表1~4に記載のバイオセンサー蛋白質が示すとおり、リンカーYのアミノ酸配列のうち「GFPの148番目に相当するアミノ酸」が、酸性側鎖を持つ場合(G52のAsp、G18、G79のGlu)、お

より水酸基をその側鎖の一部に持つ場合 (G3, G17のSer, G22のThr, G47のTyr)、機能的に反応性のあるバイオセンサーを形成しやすいことが判る。逆に塩基性側鎖を持つ場合 (G62のLys, G19, G75のArg)、反応性が乏しくなる傾向がある。また、「GFPの148番目に相当するアミノ酸」が水酸基をその側鎖の一部に持つときには、更に光異性化特性をもつようになる。更に、「GFPの147番目に相当するアミノ酸」も、バイオセンサー蛋白質の反応性に影響を与えることが判る。この「147番目に相当するアミノ酸」は、Leu>Thr>Glyの順に、バイオセンサーの反応性に良い影響を及ぼす。しかし、「147番目に相当するアミノ酸」Proは、148番目のArgの反応性を上げる効果は乏しい (G19)。このようにリンカーの配列を種々変更させることにより、適切なリンカーの配列を絞り込むことができる。

【0059】融合蛋白質の作成は、公知の遺伝子工学的手法を用いて行うことができる。例えば、融合したい各蛋白質部分をコードする遺伝子 (即ち、変更GFPおよび機能性分子をコードする遺伝子) の断片をそれぞれPCRにより作成し、これら断片をつなぎ合わせることにより融合遺伝子を作成し、次いで、この融合遺伝子を含むプラスミドを所望の細胞に導入して発現させることにより、融合蛋白質はつくられる。

【0060】(C) 前記種々の融合蛋白質に、前記機能性分子の立体構造に影響を及ぼす因子を作用させる工程：工程 (B) により得られた融合蛋白質が有している機能性分子の立体構造に影響を及ぼす分子としては、当該機能性分子に結合する等の作用をして機能性分子の立体構造に影響を与える分子そのものを使用することもできるし、あるいは、機能性分子の立体構造に影響を与える分子を細胞内で増大させるように機能することが知られている分子を使用することもできる。

【0061】機能性分子がカルモジュリン蛋白質およびミオシン軽鎖キナーゼの場合、機能性分子の立体構造に影響を及ぼす因子として、カルモジュリンに結合してカルモジュリンの立体構造を変化させるカルシウムイオンを使用してもよいし、あるいは、融合蛋白質を発現している細胞のカルシウムイオン濃度を増大させることができている作用因子、例えばATP、カルバコール、カフェイン、タブシガルジン等を使用してもよい。これらの因子を作用させることにより、当該融合蛋白質のバイオセンサー (カルシウムセンサー) としての機能を確認することができる。

【0062】あるいは、機能性分子がCRE結合蛋白質 (CREB) とCREB結合蛋白質 (CBP) の場合、バイオセンサーとしての機能を確認するために使用する作用因子としては、例えばAキナーゼを使用することができる。

【0063】機能性分子の立体構造に影響を及ぼす因子

を作用させる方法としては、例えば、変更GFPと機能性分子との融合蛋白質を産生している細胞をレーザー顕微鏡のステージ上のチャンバーに入れ、作用因子を当該細胞に添加することにより行われる。この方法は、その後の融合蛋白質の蛍光特性の変化を観察することを考慮している点で好ましい。なお、作用因子は、例えばATPやカルバコールを用いる場合、灌流液 (HBS) に懸濁し、20～300μMの濃度で添加することが適切である。

【0064】(D) 前記種々の融合蛋白質のなかから、前記 (C) 工程により蛍光特性に変化が現れる融合蛋白質をバイオセンサー蛋白質として選択する工程：工程 (C) の作用により蛍光特性に変化が現れる融合蛋白質を、蛍光を検出することが可能な装置、例えばレーザー顕微鏡もしくは蛍光顕微鏡に取りつけられたCCDカメラ等を用いて検出し、これらをバイオセンサー蛋白質として選択する。ここで「蛍光特性に変化が現れる」とは、蛍光顕微鏡もしくはレーザー顕微鏡等で捉えることができる程度の変化が起こることをいい、好ましくは肉眼で捉えることができる程度の変化が現れることをいう。例えば、蛍光特性の変化が蛍光強度の変化である場合、蛍光の変化量ΔF/Fが、好ましくは、少なくとも0.1以上変化すること、より好ましくは1～10の範囲で変化することをいう。

【0065】工程 (D) で選択されたバイオセンサー蛋白質は、センサーとして感知する因子の有無に応じて、当該蛋白質の蛍光特性が可逆的に変化し得る状態にある。

【0066】このようにGFPの蛍光特性が可逆的に変化し得るよう改変されたバイオセンサー蛋白質は、蛍光特性が変化し得る臨界状態にあるということもできる。

【0067】例えば、蛍光特性が蛍光強度である場合、バイオセンサー蛋白質は、蛍光を発する状態と蛍光を発しない状態の臨界状態にある。この臨界状態においてバイオセンサー蛋白質は、蛍光を発していない状態にあってもよいし、蛍光強度の低い状態にあってもよい。あるいは、変更GFPは蛍光強度の高い状態にあってもよい。ここで、蛍光を発していないとは、光学機器を使用して蛍光を確認できることをいう。蛍光強度が低いとは、センサーとして感知する因子の存在により、上述の変化量 (ΔF/Fが少なくとも0.1以上変化する量) を示して、蛍光強度が高い状態に変化し得る程度に低いことをいう。同様に、蛍光強度が高いとは、センサーとして感知する因子の存在により、上述の変化量 (ΔF/Fが少なくとも0.1以上変化する量) を示して、蛍光強度が低い状態に変化し得る程度に高いことをいう。

【0068】バイオセンサー蛋白質が臨界状態にあって蛍光強度の高い状態は、僅かな立体構造の変化によりその蛍光を発しなくなる「ぎりぎり蛍光を強く発していら

れる状態」ということもできる。また、バイオセンサー蛋白質が臨界状態にあって蛍光を発していない状態は、僅かな立体構造の変化により蛍光を発する状態に変化し得る「ぎりぎり蛍光を発することができない状態」ということもできる。同様に、バイオセンサー蛋白質が臨界状態にあって蛍光強度が低い状態も、僅かな立体構造の変化により蛍光を強く発する状態に変化し得る「ぎりぎり蛍光を弱くしか発することができない状態」ということもできる。

【0069】上述のようにバイオセンサー蛋白質を臨界状態にする理由は、センサーの感知する因子の有無によって敏感に反応し、その立体構造が可逆的に変化し、それに伴ってその蛍光特性が可逆的に変化する状態（例えば、蛍光を発する状態と蛍光を発しない状態との間を可逆的に行き来するような状態）を作り出すためである。バイオセンサー蛋白質は、このような臨界状態にあることにより、バイオセンサーとして機能し得る状態にあるということができる。

【0070】[バイオセンサー蛋白質およびバイオセンサー遺伝子] 本発明のバイオセンサー蛋白質は、上述のバイオセンサー蛋白質を作成する方法により選択されたものをいう。また、本発明のバイオセンサー遺伝子は、本発明のバイオセンサー蛋白質をコードする遺伝子をいい、本発明のバイオセンサー蛋白質を細胞で発現させるために使用するものである。

【0071】本発明のバイオセンサー蛋白質は、  
(1) 蛍光特性に影響を及ぼすホットスポットアミノ酸残基の近傍で緑色蛍光蛋白質のアミノ酸配列を切断して前記蛋白質の構造を変更した変更GFP、および  
(2) 自身の立体構造の変化を前記変更GFPに伝えることにより、前記変更GFPの立体構造を変化させ、蛍光特性を変化させるように機能する機能性分子を含むことを特徴とする。

【0072】バイオセンサー蛋白質が構成要素として含む変更GFPは、上記規定したとおりであり、好ましくは、ホットスポットアミノ酸残基の近傍でGFPのアミノ酸配列を切断し、次いで、切断部位のアミノ酸を除去することによりGFPの分子構造を変更し、必要に応じてGFP本来のN末端と本来のC末端とを適切なアミノ酸配列で連結したものである。

【0073】また、機能性分子も、上記規定したとおりであり、機能性分子自身が、機能性分子に作用する因子（即ち、バイオセンサーが感知する因子）の結合等の作用により、立体構造に変化を起こし得る分子であって、自身の立体構造の変化を変更GFPに伝え得る分子である。

【0074】変更GFP、機能性分子とともに、上記規定されるようなものであれば限定されない。

【0075】また、上述のとおり、本発明のバイオセンサー蛋白質は、機能性分子が、自身の立体構造の変化を

変更GFPに伝達し変更GFPの構造に変化を及ぼし得る位置で、変更GFPに連結されている必要がある。従って機能性分子は、本来のGFP構造を変更した部分に近接して連結されていることが好ましい。具体的には、GFPを切断した位置にリンカー分子を介して連結されていることが好ましい。

【0076】更に、本発明のバイオセンサー蛋白質として機能するためには、センサー蛋白質が感知する因子の有無により、センサー蛋白質の蛍光特性が可逆的に変化し得ることが要求される。本発明では蛍光特性の一例として、蛍光強度を使用する。上述したとおり、本発明のバイオセンサー蛋白質は、蛍光を発する状態と蛍光を発しない状態の臨界状態にあり、その蛍光特性を可逆的に変化し得るものである。

【0077】また、本発明のバイオセンサー蛋白質は、好ましくはそのホットスポットアミノ酸残基がGFPの148番目、94番目、もしくは222番目のアミノ酸残基である。

【0078】GFPの148番目のアミノ酸残基をホットスポットアミノ酸残基として採用したバイオセンサー蛋白質は、好ましくは、下記(1)、(2)の配列を含むことを特徴とする：

(1) 下記(a)、(b)のアミノ酸配列を、N末端から順に有する変更緑色蛍光蛋白質：

(a) 緑色蛍光蛋白質のX～238番目のアミノ酸配列、

(b) 緑色蛍光蛋白質の1～Y番目のアミノ酸配列、（ここで、Xは148～150の任意の位置であり、Yは140～147の任意の位置である）、および

(2) 自身の立体構造の変化を前記変更緑色蛍光蛋白質に伝えることにより、前記変更緑色蛍光蛋白質の立体構造を変化させ、蛍光特性を変化させるように機能する機能性分子。

【0079】また、GFPの148番目のアミノ酸残基をホットスポットアミノ酸残基として採用したバイオセンサー蛋白質の、より具体的な例としては、下記(a)～(h)の配列を、N末端から順に有することを特徴とする：

(a) メチオニンを含むアミノ酸配列（リンカーX）；

(b) ミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質もしくはその一部のアミノ酸配列；

(c) 前述の(b)の配列と後述の(d)の配列とを連結するアミノ酸配列（リンカーY）；

(d) 緑色蛍光蛋白質のX～238番目のアミノ酸配列（ここで、Xは148～150の任意の位置である）；

(e) 前述の(d)の配列と後述の(f)の配列とを連結するアミノ酸配列；

(f) 緑色蛍光蛋白質の1～Y番目のアミノ酸配列（ここで、Yは140～147の任意の位置である）；

(g) 前述の(f)の配列と後述の(h)の配列とを連結するアミノ酸配列；

結するアミノ酸配列（リンカーZ）；

（h）カルモジュリン蛋白質もしくはその一部のアミノ酸配列。

【0080】ここで、（a）のリンカーXは、メチオニンを含む任意のアミノ酸配列であるが、好ましくは1～10個のアミノ酸であり、より好ましくはMet-Xaa-Xaa（Xaaは任意のアミノ酸）であり、更に好ましくはMet-Gly-Thr、Met-Val-Aspである。（c）のリンカーYは、任意のアミノ酸配列であるが、好ましくは0～10個のアミノ酸であり、より好ましくは、リンカーYのアミノ酸配列のうち「GFPの147番目に相当するアミノ酸」がLeu、Thr、またはGlyで、「GFPの148番目に相当するアミノ酸」が、酸性側鎖または水酸基をその一部に含む側鎖を持つアミノ酸であり、更に好ましくはLeu-Gluである。（e）の連結アミノ酸は、好ましくは、2～1

0個のアミノ酸であり、より好ましくは、グリシン等のペプチドの主鎖の動きに大きな自由度を与え、主鎖をフレキシブルにするようなアミノ酸を多く含むアミノ酸配列であり、更に好ましくはGly-Gly-Thr-Gly-Gly-Serである。（g）のリンカーZは、任意のアミノ酸配列であるが、好ましくは0～10個のアミノ酸であり、より好ましくは2～3個のアミノ酸であり、更に好ましくはThr-Argである。

【0081】上述のGFPの148番目のアミノ酸残基をホットスポットアミノ酸残基として用いた種々のバイオセンサー蛋白質の例を下記表1～2に列挙する。機能性分子としてはミオシン軽鎖キナーゼ（M13）およびカルモジュリン（CaM）を使用した。

【0082】

【表1】

表 1

プローブ・ナンバー	リンカーX	M13	リンカーY	cpEGFP	リンカーZ	CaM	蛍光	ATP応答(ΔF/F)	光異性化
G3	MGT	O	TS	149-144	GTR	O	+	0.6	+
G4	MGT	O	TS	149-144	GTR	CN	+	1.6	+
G6	MGT	O	TS	148-144	GTR	O	~	nt	nt
G7	MGT	O	TS	147-144	GTR	O	+	0	-
G8	MGT	O	TS	146-144	GTR	O	+	0	-
G9	MGT	O	TS	151-144	GTR	O	+	0	-
G10	MGT	O	TS	153-144	GTR	O	*	nt	-
G11	MGT	O	TS	155-144	GTR	O	*	nt	-
G12	MGT	O	TS	149-140	GTR	O	+	0	+
G13	MGT	O	TS	148-140	GTR	O	+	0.2	+
G14	MGT	O	TS	147-140	GTR	O	*	nt	nt
G15	MGT	O	TS	146-140	GTR	O	*	nt	nt
G16	MGT	O	TS	145-140	GTR	O	*	nt	nt

【0083】

【表2】

表 2 (表1のつづき)

プローブ・ナンバー	リンカーX	M13	リンカーY	c <sub>p</sub> EGFP	リンカーZ	CaM	蛍光	ATP応答(ΔF/F)	光異性化
G22	MGT	O	TS	150-144	GTR	O	+	0.6	+
G23	MGT	O	TS	149-147	GTR	CN	+	0.2	+
G24	MGT	O	TS	149-146	GTR	CN	*	nt	nt
G25	MGT	O	TS	149-145	GTR	CN	*	nt	nt
G27	MGT	O	TS	150-147	GTR	CN	+	1.0	+
G28	MGT	O	TS	151-147	GTR	CN	-	nt	nt
G29	MGT	O	TS	153-147	GTR	CN	-	nt	nt
G30	MGT	O	TS	155-147	GTR	CN	-	nt	nt

【0084】表1～2に記載のバイオセンサー蛋白質は、N末端から順に  
メチオニンを含むアミノ酸配列（リンカーX）；  
ミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質の一部のアミノ酸配列（M13）；  
連結アミノ酸配列（リンカーY）；  
改変GFP（c<sub>p</sub>EGFP）；  
連結アミノ酸配列（リンカーZ）；  
カルモジュリン蛋白質の2～148番目のアミノ酸配列（CaM）を有する。

【0085】ここで機能性分子として使用したラットカルモジュリンのアミノ酸配列を配列番号2に示す。配列番号2に記載のアミノ酸配列における1～148番のアミノ酸は、本明細書に記載される「カルモジュリン蛋白質のn番目のアミノ酸」と対応する。尚、カルモジュリンはアミノ酸に翻訳された後、N末のメチオニンが翻訳後修飾を受けて切れてなくなるため、配列番号2ではN末のメチオニンの記載を省いた。

【0086】また、機能性分子として使用したミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質の一部のアミノ酸配列（M13）を配列番号3に示す。このM13断片をコードする遺伝子配列は、ニワトリのM13断片をコードする遺伝子配列を改変したものである（Guerriero, V et al Biochemistry 25 8372-8381 (1986)）。

【0087】表1～2において、種々のバイオセンサー蛋白質は、プローブ・ナンバーとして名称が付されている。例えば、プローブ・ナンバーG3（以下、G3ともいう）については、その構造を一次元的に図2に示す。G3は、N末端から順にリンカーX（Met-Gly-Thr）；ミオシン軽鎖キナーゼの一部（Ser-Ser-Arg-Arg-Lys-Tr

p-Asn-Lys-Thr-Gly-His-Ala-Val-Arg-Ala-Ile-Gly-Arg-Leu-Ser-Ser）；

リンカーY（Thr-Ser）；

改変GFP（N末端から順に、GFPの149～238番目のアミノ酸配列、連結アミノ酸（Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Ser）、GFPの1～144番目のアミノ酸配列）；

リンカーZ（Gly-Thr-Arg）；ラットのカルモジュリンの2～148番目のアミノ酸を有する。

【0088】表1～2において、リンカーX、Y、Zのアミノ酸配列は一文字表記で示す。また、M13の

「O」は、（Ser-Ser-Arg-Arg-Lys-Trp-Asn-Lys-Thr-Gly-His-Ala-Val-Arg-Ala-Ile-Gly-Arg-Leu-Ser-Ser）の配列を意味する。c<sub>p</sub>EGFPの「149-144」は、改変GFPがN末端から順に、GFPの149～238番目のアミノ酸配列、連結アミノ酸（Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Ser）、GFPの1～144番目のアミノ酸配列を有することを意味する。CaMの「O」は、ラットの本来のカルモジュリン2～148番目のアミノ酸配列を意味し、「CN」は、カルモジュリンのミュータントCaMCNの2～148番目のアミノ酸配列（Persechini A et al 1997 Cell Calcium 22, 209-216）を意味する。蛍光の

「+」は、ATP添加前に弱い蛍光を発しているものを意味し、「-」はATP添加前に蛍光を発していないものを意味し、「\*」は、細胞内カルシウム濃度が2mM程度の高カルシウム状態で弱い蛍光を発するものを意味する。ATP応答(ΔF/F)の値は、各バイオセンサー蛋白質を産生する細胞（HEK細胞）のATP添加前と添加後の蛍光強度の変化量の値(ΔF)をATP添加前の蛍光強度(F)で割った値(Arbitraryunit)である。

「nt」は、not testedを意味する。また、光異性化

(Photoisomerization) の「+」は、バイオセンサー蛋白質が光異性化を起こすことを意味し、「-」は、光異性化を起こさないことを意味する。

【0089】表1～2の結果より、c p E G F PのN末を145～155番目のアミノ酸の間で変化させ、C末を140～147番目のアミノ酸の間で変化させてATPの反応を測定したところ、N末が149または150番目のアミノ酸で始まるものが反応性が高かった。C末は、140、144、147番目でATP感受性のある分子を得た。

【0090】ここで、148番目のアミノ酸は、リンカーYに含まれると考えてよい。即ち、変改GFPのN末が、本来のGFPの149番目のアミノ酸から始まるとき、この変改GFPのN末に隣接するリンカーYのアミノ酸を「GFPの148番目に相当するアミノ酸」と考えることができる。また同様に、変改GFPのN末が、本来のGFPの150番目のアミノ酸から始まるとき、この変改GFPのN末に隣接するリンカーYのアミノ酸からN末側に2個溯ったアミノ酸を「GFPの148番目に相当するアミノ酸」と想定することができる。

【0091】GFPの148番目のアミノ酸残基をホットスポットアミノ酸残基として採用したバイオセンサー蛋白質は、より好ましくは、

(1) 下記(a)、(b)のアミノ酸配列を、N末端から順に有する変改緑色蛍光蛋白質：

(a) 緑色蛍光蛋白質の149～238番目のアミノ酸配列、

(b) 緑色蛍光蛋白質の1～144番目のアミノ酸配列、および

(2) 自身の立体構造の変化を前記変改緑色蛍光蛋白質に伝えることにより、前記変改緑色蛍光蛋白質の立体構造を変化させ、蛍光特性を変化させるように機能する機能性分子を含むことを特徴とする。

【0092】また、上述のより好ましいバイオセンサー蛋白質の、より具体的な例としては、下記(a)～(h)の配列を、N末端から順に有することを特徴とする：

(a) メチオニンを含むアミノ酸配列(リンカーX)；

(b) ミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質もしくはその一部

のアミノ酸配列；

(c) 前述の(b)の配列と後述の(d)の配列とを連結するアミノ酸配列(リンカーY)；

(d) 緑色蛍光蛋白質の149～238番目のアミノ酸配列；

(e) 前述の(d)の配列と後述の(f)の配列とを連結するアミノ酸配列；

(f) 緑色蛍光蛋白質の1～144番目のアミノ酸配列；

(g) 前述の(f)の配列と後述の(h)の配列とを連結するアミノ酸配列(リンカーZ)；および

(h) カルモジュリン蛋白質もしくはその一部のアミノ酸配列。

【0093】ここで、(a)のリンカーXは、メチオニンを含む任意のアミノ酸配列であるが、好ましくは1～10個のアミノ酸であり、より好ましくはMet-Xaa-Xaa(Xaaは任意のアミノ酸)であり、更に好ましくはMet-Gly-Thr、Met-Val-Aspである。(c)のリンカーYは、任意のアミノ酸配列であるが、好ましくは0～10個のアミノ酸であり、より好ましくは2個のアミノ酸で、「GFPの147番目に相当するアミノ酸」がLeu、Thr、またはGlyで、「GFPの148番目に相当するアミノ酸」が、酸性側鎖または水酸基をその一部に含む側鎖を持つアミノ酸であり、更に好ましくはLeu-Gluである。

(e)の連結アミノ酸は、好ましくは、2～10個のアミノ酸であり、より好ましくは、グリシン等のペプチドの主鎖の動きに大きな自由度を与え、主鎖をフレキシブルにするようなアミノ酸を多く含むアミノ酸配列であり、更に好ましくはGly-Gly-Thr-Gly-Gly-Serである。

(g)のリンカーZは、任意のアミノ酸配列であるが、好ましくは0～10個のアミノ酸であり、より好ましくは2～3個のアミノ酸であり、更に好ましくはThr-Argである。

【0094】上述のより好ましいバイオセンサー蛋白質の種々の例を下記表3～4に列挙する。機能性分子としてはミオシン軽鎖キナーゼ(M13)およびカルモジュリン(CaM)を使用した。

【0095】

【表3】

表 3

プローブ・ナンバー	リンカーX	M13	リンカーY	cPEGFP	リンカーZ	CaM	ATP応答(ΔF/F)	n	光異性化
G 3	MGT	O	TS	149-144	GTR	O	0.7	28	+++
G 17	MGT	O	GS	149-144	GTR	O	0.3	11	+++
G 18	MGT	O	LE	149-144	GTR	O	1.6	78	-
G 19	MGT	O	PR	149-144	GTR	O	0	12	-
G 41	MGT	O	TI	149-144	GTR	O	0	18	-
G 44	MGT	O	TP	149-144	GTR	O	0	21	-
G 46	MGT	O	TA	149-144	GTR	O	0	12	-
G 47	MGT	O	TY	149-144	GTR	O	0.7	19	++
G 49	MGT	O	TQ	149-144	GTR	O	0	18	-
G 50	MGT	O	TN	149-144	GTR	O	0	18	-
G 52	MGT	O	TD	149-144	GTR	O	0.3	20	-
G 54	MGT	O	TC	149-144	GTR	O	0.3	21	-
G 55	MGT	O	TW	149-144	GTR	O	0	20	-
G 56	MGT	O	TG	149-144	GTR	O	0	20	-
G 58	MGT	O	TV	149-144	GTR	O	0	23	-

【0096】

【表4】

表 4 (表3のつづき)

プローブ・ナンバー	リンカーX	M13	リンカーY	cPEGFP	リンカーZ	CaM	ATP応答(ΔF/F)	n	光異性化
G 61	MGT	O	TF	149-144	GTR	O	0.5	22	-
G 62	MGT	O	TK	149-144	GTR	O	0	28	-
G 72	MGT	O	LE	149-144	TR	O	1.6	67	-
G 75	MGT	O	TR	149-144	GTR	O	0	29	-
G 76	MGT	O	TM	149-144	GTR	O	0.6	23	-
G 77	MGT	O	TT	149-144	GTR	O	0.1	10	+++
G 79	MGT	O	TE	149-144	GTR	O	0.5	26	-
G 80	MGT	O	TH	149-144	GTR	O	0.3	23	+
G 81	MGT	O	TL	149-144	GTR	O	0.6	8	-
G 85	MVD	O	LE	149-144	TR	O	1.5	16	-
G 22	MGT	O	TS	150-144	GTR	O	0.6	26	+++

【0097】表3～4に記載のバイオセンサー蛋白質は、N末端から順に  
 メチオニンを含むアミノ酸配列（リンカーX）；  
 ミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質の一部のアミノ酸配列（M13）；  
 種々の連結アミノ酸配列（リンカーY）；  
 改変GFP（cPEGFP）；  
 連結アミノ酸配列（リンカーZ）；

カルモジュリン蛋白質の2～148番目のアミノ酸配列（CaM）を有する。

【0098】表3～4において、種々のバイオセンサー蛋白質は、プローブ・ナンバーとして名称が付されている。例えば、プローブ・ナンバーG85（以下、G85ともいう）については、その構造を一次元的に図2に示す。G85は、N末端から順に  
 リンカーX（Met-Val-Asp）；

ミオシン軽鎖キナーゼの一部 (Ser-Ser-Arg-Arg-Lys-Trp-Asn-Lys-Thr-Gly-His-Ala-Val-Arg-Ala-Ile-Gly-Arg-Leu-Ser-Ser) ;

リンカーY (Leu-Glu) ;

改变GFP (N末端から順に、GFPの149~238番目のアミノ酸配列、連結アミノ酸 (Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Ser)、GFPの1~144番目のアミノ酸配列) ;

リンカーZ (Thr-Arg) ;

ラットのカルモジュリンの2~148番目のアミノ酸を有する。

【0099】表3~4において、リンカーX、Y、Zのアミノ酸配列は一文字表記で示す。また、M13の「O」は、(Ser-Ser-Arg-Arg-Lys-Trp-Asn-Lys-Thr-Gly-His-Ala-Val-Arg-Ala-Ile-Gly-Arg-Leu-Ser-Ser)の配列を意味する。cPEGFPの「149-144」は、改变GFPがN末端から順に、GFPの149~238番目のアミノ酸配列、連結アミノ酸 (Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Ser)、GFPの1~144番目のアミノ酸配列を有することを意味する。CaMの「O」は、ラットの本来のカルモジュリン2~148番目のアミノ酸配列を意味する。ATP応答 ( $\Delta F/F$ ) の値は、各バイオセンサー蛋白質を産生する細胞 (HEK細胞) のATP添加前と添加後の蛍光強度の変化量の値 ( $\Delta F$ ) をATP添加前の蛍光強度 ( $F$ ) で割った値 (Arbitrary unit) である。「n」は、試験した細胞の数を意味する。また、光異性化 (Photoisomerization) の「+」は、バイオセンサー蛋白質が光異性化を起こすことを意味し、「-」は、光異性化を起こさないことを意味する。

【0100】表3~4では、主にリンカーX、Y、Zのアミノ酸を変化させて、そのATPに対する反応性を調べた。カルモジュリン断片 (2~148番目) を用いて、リンカーYの配列がLeu-Gluであるものが最も反応性が

良かった。リンカーZの配列は、Gly-Thr-ArgでもThr-ArgでもATPに対する反応性に変化はなかった。リンカーXの配列はMet-Gly-ThrでもMet-Val-AspでもATPに対する反応性に変化はなかった。また、G22に関してはG3のcPEGFP (149-144) より一つアミノ酸が少なくなっているが、反応性に大きな変化はなかった。

【0101】表3~4に示すとおり、改变GFPのN末端が本来のGFPの149番目のアミノ酸から始まり、リンカーYに「GFPの148番目に相当するアミノ酸」としてグルタミン酸 (Glu) をもつもの (プローブ・ナンバーG18、G72、G85) が最も良好な反応性を示し、ATPに対する蛍光の変化量  $\Delta F/F$  について 1.5 ~ 1.6 の値を示した。また、改变GFPのN末端が本来のGFPの150番目のアミノ酸から始まり、リンカーYに「GFPの148番目に相当するアミノ酸」としてトレオニン (Thr) をもつもの (G22) も反応性 ( $\Delta F/F = 0.6$ ) はやや劣るものの充分なカルシウム感受性を有することが明らかとなった。

【0102】更に表3~4の結果から、148番目に対応するアミノ酸がその側鎖に水酸基を有していると、そのバイオセンサー蛋白質は光異性化を起こすことが判る。このことからも、リンカーYの二つのアミノ酸のうち、改变GFPに隣接するアミノ酸が、GFPの蛍光強度に強く関係していることが明らかである。

【0103】あるいは、上述の表1~表4に記載のバイオセンサー蛋白質とは別に、GFPの148番目のアミノ酸残基をホットスポットアミノ酸残基としてその近傍で切断し、その切断された間に機能性分子を連結させたバイオセンサー蛋白質の例を表5に挙げる。

【0104】

【表5】

表 5

プローブ・ナンバー	改变GFPのN末端	リンカーA	CAM	リンカーB	M13	リンカーC	改变GFPのC末端	蛍光	ATP応答 ( $\Delta F/F$ )	光異性化
A1	1-144	GTR	O	GT	O	TS	149-238	+	0.3*	+
A2	1-144	GTR	O	GTGSGGGS	O	TS	149-238	+	0.5	+

【0105】表5に記載のバイオセンサー蛋白質は、N末端から順に

緑色蛍光蛋白質の1~144番目のアミノ酸配列；

リンカーA；

ミオシン軽鎖キナーゼの一部のアミノ酸配列 (M13)；

リンカーB；

ラットのカルモジュリンの2~148番目のアミノ酸配列 (CaM)；

リンカーC；

GFPの149~238番目のアミノ酸配列を有する。

【0106】表5において、リンカーA、B、Cのアミノ酸配列は一文字表記で示す。また、M13の「O」は、(Ser-Ser-Arg-Arg-Lys-Trp-Asn-Lys-Thr-Gly-His-Ala-Val-Arg-Ala-Ile-Gly-Arg-Leu-Ser-Ser)の配列を意味する。CaMの「O」は、ラットの本来のカルモジュリン2~148番目のアミノ酸配列を意味する。蛍光の「+」は、ATP添加前に弱い蛍光を発していることを意味する。ATP応答 ( $\Delta F/F$ ) の値は、各バイオセンサー蛋白質を産生する細胞 (HEK細胞) のATP添加前と添加後の蛍光強度の変化量の値 ( $\Delta F$ ) をATP添加前の蛍光強度 ( $F$ ) で割った値 (Arbitrary unit) である。

る。ATP応答における\*は、ATPの代わりにカルバコールを用いたときの応答を意味する。また、光異性化(Photoisomerization)の「+」は、バイオセンサー蛋白質が光異性化を起こすことを意味する。

【0107】表5は、GFP本来のN末端およびC末端をもつバイオセンサーのグループのATPに対する反応性を示しており、このグループはATPに対して弱いながら反応した。リンカーBの長さを長くしたA2の方が反応性は良かった。このタイプはリンカーA、B、Cを検討することにより、より高い反応性の分子を作ることができると考えている。

【0108】以上、表1～表5に示す結果から、GFPには蛍光強度に強い影響を与えるホットスポットアミノ酸残基(GFPの148番目のアミノ酸残基)が存在することが明らかとなり、このアミノ酸残基を介してGFPの蛍光強度を効率的に制御することが可能となった。同様に、148番目のアミノ酸残基以外に、94、96、222番目のアミノ酸残基でもGFPの蛍光強度を制御できるバイオセンサーが作成され得ることが、GFPの結晶構造から推察される。

【0109】本発明のバイオセンサー蛋白質は、上述のとおり、機能性分子としてカルモジュリン蛋白質(もしくはその一部)およびミオシン軽鎖キナーゼ(もしくはその一部)を使用したものが挙げられるが、これに限定されない。即ち、本発明のバイオセンサー蛋白質は、上述のカルシウムセンサーとして機能し得るものに限定されない。

【0110】本発明のカルシウムセンサー蛋白質の特に好ましい例としては、下記(a)～(h)の配列を、N末端から順に有することを特徴とする：

- (a) Met-Gly-ThrまたはMet-Val-Asp(リンカーX)；
- (b) ミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質の一部のアミノ酸配列(Ser-Ser-Arg-Arg-Lys-Trp-Asp-Lys-Thr-Gly-His-Ala-Val-Arg-Ala-Ile-Gly-Arg-Leu-Ser-Ser)；
- (c) Leu-Glu(リンカーY)；
- (d) 緑色蛍光蛋白質の149～238番目のアミノ酸配列；
- (e) Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Ser；
- (f) 緑色蛍光蛋白質の1～144番目のアミノ酸配列；
- (g) Gly-Thr-ArgまたはThr-Arg(リンカーZ)；および
- (h) ラットのカルモジュリン蛋白質の2～148番目のアミノ酸配列。

【0111】本発明において作成されたカルシウムセンサーは、細胞内および細胞外でカルシウム濃度を測定する際に使用することができる。

【0112】例えば、本発明のカルシウムセンサー遺伝子を大腸菌などに導入して予めつくらせたカルシウムセ

ンサー蛋白質と検体とを混合することによりカルシウム濃度を測定することが可能である。また、大腸菌などを使用してつくらせた蛋白質を、カルシウム濃度を測定したい細胞に直接注入することにより細胞内のカルシウム濃度を測定することもできる。あるいは、本発明のカルシウムセンサー遺伝子を、カルシウム濃度を測定したい細胞に導入して細胞に蛋白質を産生させることにより、細胞内のカルシウム濃度を測定してもよい。

【0113】カルシウム濃度の測定は、ある特定の波長の光(例えば、488 nmの励起光)をカルシウムセンサー蛋白質に当てるにより、センサー蛋白質の発する蛍光特性を光学機器(例えば、レーザー顕微鏡)で検出することにより行う。なお、濃度測定に使用するカルシウムセンサー蛋白質が、どのくらいのカルシウム濃度でどのような蛍光特性を示すものであるか、予め調べておくことが必要である。具体的には、例えば、大腸菌でセンサー蛋白質分子を大量に作らせて、蛍光分光光度計を用いて蛍光波長や種々のカルシウム濃度に対して蛍光強度が変化する程度を測定しておくことが必要である(図5)。本発明のバイオセンサー蛋白質は、EGFP(クローンテック社)とほぼ同様な蛍光波長特性を持ち、励起極大は489 nmであり、蛍光極大は509 nmであった。

【0114】また、本発明においてバイオセンサー遺伝子は、本発明のバイオセンサー蛋白質をコードする遺伝子のことをいう。このようなバイオセンサー遺伝子は、まず、作成したいバイオセンサー蛋白質を構成する各構成部分(例えば、変更GFPの部分、機能性分子の部分)をコードする遺伝子断片をそれぞれPCRにより作成し、次いで、これら各遺伝子断片を連結させることにより、融合遺伝子の形で作成され得る。このようにして作成されたバイオセンサー遺伝子を適切なベクター(例えば、pEGFP-N1(クローンテック社))に組込み、この組換えベクターを細胞に導入することにより、任意の細胞で所望のバイオセンサー蛋白質を産生させることが可能となる。

【0115】【本発明のバイオセンサー蛋白質の性能の確認】本発明のバイオセンサー蛋白質は、そのセンサーとしての性能を実験的に確認しておくことが必要である。

【0116】本発明において実際に開発したカルシウムセンサーは、培養細胞human embrionic kidney(HEK)293 cellおよびマウスの骨格筋初代培養細胞にその遺伝子を取り込ませて性能の評価を行った。

【0117】プローブ・ナンバーG85のカルシウムセンサーをHEK 293細胞中で当該遺伝子(その配列を配列番号4に示す)を用いて発現させ、次いで細胞のカルシウムイオン濃度を増大させることが既知の因子として、ATP(0.1 mM)およびカルバコール(CCH)(0.1 mM)を作用させた。そのときの反応例を図3に示す。

【0118】HEK 293細胞でのATPに対する蛍光の変

化量は、元の蛍光強度の約1.6倍に達し、蛍光顕微鏡下で肉眼でもこれらの変化を捉えることが可能であった。カルバコールに対する蛍光の変化量は、元の蛍光強度の約2.2倍に達した。また、イオノマイシン(0.01 mM)とカルシウムイオン(2 mM)の添加により細胞内を高カルシウムの状態にすると、カルシウムセンサーの蛍光強度は最大に達することが確認された。一方、カルシウムイオンを添加せず、イオノマイシン(0.01 mM)とEDTA(10 mM)を添加することにより細胞内のカルシウム濃度をゼロに近づけると、センサーの蛍光強度は最小になることが確認された。

【0119】また、同様にしてカルシウムセンサー(G85)を発現している骨格筋初代培養細胞に、細胞のカルシウムイオン濃度を増大させることができ既知の因子、カルバコール(0.1 mM)およびカフェイン(10 mM)を作用させた。そのときの反応例を図4に示す。図3の結果と同様、カルバコールに対する蛍光の変化量は、元の蛍光強度の約2.5倍に達し、カフェインに対する蛍光の変化量は約1.1倍に達した。

【0120】更に図5において、カルシウム濃度とカルシウムセンサー(G85)の蛍光量との関係をグラフ化した。なお、G85は大腸菌を用いてつくらせたものである。図5に示すように、本発明のカルシウムセンサー蛋白質は、非常に高いカルシウム感受性を有していた。この感受性の高さは、従来技術の欄で挙げた一つのGFPから成るカルシウム感受性蛋白質よりも約30倍高いカルシウム感受性であった。

【0121】このように本発明のカルシウムセンサーは、センサーとしての性能の高さが証明されている。

【0122】

【実施例】カルシウムセンサーの製法および測定法  
例としてプローブ・ナンバーG3をコードしているpN1-G3の作成について：

1. [平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼM13]

平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼのM13(配列番号3)を、片山化学にて合成した下記の合成プライマーから作製する。即ち、平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼのM13に対する2つのプライマー

smMLCKM13-1プライマー

(GCGCTAGCCGCCACCATGGGTACCTCATCACGTCGTAAAGTGGAAATAAGACAGGTACCGCAGTCAGA ; 配列番号5) と

smMLCKM13-2プライマー

(GGCGCGGCCGCTCAACTAGTTGAGCTCAGCCGACCTATAGCTCTGACTGCGTGACCTGTCTT ; 配列番号6)

をテンプレート兼プライマーとしてPolymerase chain reaction (PCR)を行う。アガロースゲル電気泳動を行い、目的のPCR産物をゲルから回収したのちNheIとSpeIで制限酵素処理しPCRフラグメント1を得る。

【0123】2. [変形GFP (circularly permuted enhanced GFP ; c p E G F P ) ]

GFPをコードするcDNAを含んでいるプラスミドpEGFP-N1(Clontech社から発売されている)をテンプレートとしてEGFP-31プライマー(GGACCGTACTAGTAACGCTATATCATGGCCGAC ; 配列番号7)とEGFP-20プライマー(CCGGTACCGGCCCTTGTACAGCTCGTCATGCC ; 配列番号8)

を使用してPCRを行う。アガロースゲル電気泳動を行い、目的のPCR産物をゲルから回収したのちSpeIとKpnIで制限酵素処理しPCRフラグメント2を得る。

【0124】同じくpEGFP-N1をテンプレートとしてEGFP-21プライマー(GCGGTACCGGAGGGAGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG ; 配列番号9)とEGFP-30プライマー(GGACCGTCCCGTTGACTCCAGCTTGTGCC ; 配列番号10)

を使用してPCRを行う。アガロースゲル電気泳動を行い、目的のPCR産物をゲルから回収したのちKpnIとMluIで制限酵素処理しPCRフラグメント3を得る。

【0125】3. [カルモジュリン(CaM)]

ラットのカルモジュリンcDNA(配列番号2 ; アクセション番号M19312 (MoriM 2000 Biochemistry 39, 1316-1323))をコードするプラスミドrCaMをテンプレートとして、ラットのカルモジュリンに対するプライマー

rCaM-2プライマー(GGACCGT GAC CAA CTG ACT GAA GAG CAG ; 配列番号11)と

rCaM-10プライマー(GOGCGGCCGCTCACTCGCTGTCACTATTG TAC ; 配列番号12)

を用いてPCRを行う。アガロースゲル電気泳動を行い、目的のPCR産物をゲルから回収したのちMluIとNotIで制限酵素処理しPCRフラグメント4を得る。

【0126】以上4つのPCRフラグメントを段階的にDNAligaseで結合し最終的にNheIとNotIで制限酵素処理したpEGFP-N1 vectorに組み込んだ。

【0127】各実験でプライマーは合成プライマーを使用した(サワディー社および片山化学)。

【0128】上記のPCRの条件は

テンプレートDNA 1  $\mu$ g

2種類のプライマー各10ピコモル

反応バッファー(stratagene社) 5マイクロリッター

pfu酵素(stratagene社) 2ユニット

2.5 mM dNTP(Takara社) 4マイクロリッター

水を加え、全量を50マイクロリッターとした。

【0129】PCRの反応温度は

1) 94度2分 1サイクル

2) 94度30秒

55度30秒

72度1分 30サイクル

3) 72度2分 1サイクルで行った。

【0130】DNAのゲルからの回収はDNA Fragment Purification kit MagExtractor (Toyobo社)を用い、キットのマニュアルにしたがって行った。

【0131】アガロースゲル電気泳動は1%または2%

アガロースゲル (Agarose LE, Nakarai tesque社) を用い、TAEバッファー (1リットル中Tris base 4.98g (Nakarai tesque社), 水酢酸1.142 ml (Nakarai tesque社), 0.5M EDTA (pH 8) 2ml (EDTA:Ethyle-nediamine-N,N,N',N' tetraacetic acid disodium salt, Dojin社) ) にて電気泳動した。

【0132】制限酵素によるDNAの切断はNheI, SpeI, MluI, NotI (NEB社) を用い酵素に添付されたバッファーを使用して、DNA 1～2マイクログラムに酵素各30ユニット、バッファー10マイクロリッター、水を加え全量を100マイクロリッターとし、37度で1～3時間反応させた。DNAはその後DNA Fragment Purification kit MagExtractor (Toyobo社) を用いキットのマニュアルにしたがって回収した。

【0133】Ligation反応にはDNA Ligation kit (Takara社) を用いキットのマニュアルにしたがって行った。

【0134】コンピーテントセルは大腸菌HB101 (Takara社) を用いtransformationにはカルシウムクロライド法を用いた (Molecular Cloning A laboratory Manual, 2ndEdition, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis著, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。

【0135】大腸菌からのプラスミドの回収はQIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen社) を用いキットのマニュアルにしたがって行った。

【0136】細胞への導入：cDNA (即ち、上述の大腸菌から回収されたプラスミド) は、Superfect transfection reagent (Qiagen社) を用いてマニュアルにしたがって5×10mmのサイズのカバーガラスの上に10%牛胎児血清、30 units/ml ペニシリンと30 mg/ml ストレプトマイシンを含むDulbecco's modified Eagle培地 (Gibco BRL社) で培養したhuman embrionic kidney(HEK) 293細胞 (American Type Culture Collection) に導入した。

【0137】導入方法の詳細は以下に記載のとおりである。まず、3マイクログラムの上記cDNA (3マイクロリッター) に12.5マイクロリッターのSuperfect transfection reagentと血清を含まないDulbecco's modified Eagle培地80マイクロリッターを加え10分間室温に放置したのちに血清を含むDulbecco's modified Eagle培地を800マイクロリッター加えた溶液を、リン酸緩衝液

で1度洗浄したHEK細胞に加え、37度で2時間培養した。培養したHEK細胞をリン酸緩衝液で1度洗浄して、10%牛胎児血清を含むDulbecco's modified Eagle培地を適量 (3cmディッシュ当たり2ミリリッター) 加えて28度で2～4日培養し、実験に用いた。

【0138】測定：培養細胞の付着したカバーガラスを顕微鏡のステージの上においてチャンバーに入れ、HBS液 (107 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.5 mM glucose, 20 mM HEPES pH 7.4 (Nakarai tesque, 片山化学、HEPES: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid, Dojinから購入) ) で灌流した。100マイクロモラーのアデノシン三リン酸 (ATP、Sigma社) または100マイクロモラーのカルバコール (Sigma社) はHBSに溶かし細胞に灌流投与した。ライカTCS-NTレーザー顕微鏡を用い488nmで励起し525nmで蛍光を記録した。

【0139】

【発明の効果】以上説明したように、本発明のバイオセンサー蛋白質を作成する方法は、多種多様なバイオセンサーの開発に応用できるものである。また、本発明のバイオセンサー蛋白質の作成方法により、高性能なバイオセンサーを短期間に作成できるようになることが期待される。

【0140】本方法を利用することにより作成されたカルシウムセンサーの信号強度の変化量は大きく肉眼でも観察でき、カルシウム感受性も従来のものに比べ30倍と高くなった。また、蛋白質性のセンサーであるので、その遺伝子を取り込ませることにより容易に細胞にセンサーを発現させることができる。また、測定に特別な装置および物質を必要とせず、アルゴンレーザーを用いた検出器が利用可能であり、補酵素を必要としないという利点も有する。

【0141】更に今回開発したカルシウムセンサーは、当該蛋白質そのものを用いてカルシウム濃度を測定する機器に組み込むことができる。さらにこの蛋白質の遺伝子を組み込んだ動物、植物、組織、臓器、細胞等は、医薬品の開発および農業製品の開発に利用することができる。

【0142】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110>; Okazaki National Research Institutes  
<120>; Method for producing a biosensor protein capable of regulating  
a fluorescence property of Green Fluorescent Protein, and the biosensor  
protein produced by the method.  
<130>; A000004913  
<160>; 12  
<170>; PatentIn Ver. 2.0  
<210>; 1  
<211>; 717

<212>; DNA  
 <213>; Aequorea victoria  
 <220>;  
 <221>; CDS  
 <222>; (1)..(717)  
 <400>; 1  
 atg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc 48  
 Met Ser Lys Gly Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val  
 1 5 10 15  
 gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag 96  
 Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu  
 20 25 30  
 ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc 144  
 Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys  
 35 40 45  
 acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ctg 192  
 Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu  
 50 55 60  
 acc tac ggc gtg cag tgc ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag cag 240  
 Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln  
 65 70 75 80  
 cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc 288  
 His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg  
 85 90 95  
 acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg 336  
 Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val  
 100 105 110  
 aag ttc gag ggc gac acc ctg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc 384  
 Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile  
 115 120 125  
 gac ttc aag gag gac gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac 432  
 Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn  
 130 135 140  
 tac aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc 480  
 Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly  
 145 150 155 160  
 atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg 528  
 Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val  
 165 170 175  
 cag ctc gcc gac cac tac cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc 576  
 Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro  
 180 185 190  
 gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc acc cag tcc ggc ctg agc 624  
 Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser  
 195 200 205  
 aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg 672  
 Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val  
 210 215 220  
 acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag taa 717  
 Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys

225	230	235	
<:210>; 2			
<:211>; 447			
<:212>; DNA			
<:213>; <i>Rattus norvegicus</i>			
<:220>;			
<:221>; CDS			
<:222>; (1)..(444)			
<:400>; 2			
gct gac caa ctg act gaa gag cag atc gca gaa ttc aaa gaa gct ttc			48
Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe			
1 5 10 15			
tcc cta ttt gac aag gac ggg gat ggg aca ata aca acc aag gag ctg			96
Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu			
20 25 30			
ggg acg gtg atg cgg tct ctg ggg cag aac ccc aca gaa gca gag ctg			144
Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu			
35 40 45			
cag gac atg atc aat gaa gta gat gcc gac ggt aat ggc aca atc gac			192
Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp			
50 55 60			
tcc cct gaa ttc ctg aca atg atg gca aga aaa atg aaa gac aca gac			240
Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp			
65 70 75 80			
agt gaa gaa gaa att aga gaa gcg ttc cgt gtg ttt gat aag gat ggc			288
Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly			
85 90 95			
aat ggc tac atc agt gca gca gag ctt cgc cac gtg atg aca aac ctt			336
Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu			
100 105 110			
gga gag aag tta aca gat gaa gag gtt gat gaa atg atc agg gaa gca			384
Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala			
115 120 125			
gac atc gat ggg gat ggt cag gta aac tac gaa gag ttt gta caa atg			432
Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met			
130 135 140			
atg aca gcg aag tga			447
Met Thr Ala Lys			
145			
<:210>; 3			
<:211>; 63			
<:212>; DNA			
<:213>; Artificial Sequence			
<:220>;			
<:221>; CDS			
<:222>; (1)..(63)			
<:220>;			
<:223>; M13 segments of smooth muscle myosin light chain kinase			
<:400>; 3			
tca tca cgt cgt aag tgg aat aag aca ggt cac gca gtc aga gct ata			48

Ser Ser Arg Arg Lys Trp Asn Lys Thr Gly His Ala Val Arg Ala Ile  
 1 5 10 15  
 ggt cgg ctg agc tca 63  
 Gly Arg Leu Ser Ser  
 20  
 <;210>; 4  
 <;211>; 1251  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;221>; CDS  
 <;222>; (1)...(1248)  
 <;220>;  
 <;223>; Biosensor gene of probe number G85  
 <;400>; 4  
 atg gtc gac tca tca cgt cgt aag tgg aat aag aca ggt cac gca gtc 48  
 Met Val Asp Ser Ser Arg Arg Lys Trp Asn Lys Thr Gly His Ala Val  
 1 5 10 15  
 aga gct ata ggt cgg ctg agc tca ctc gag aac gtc tat atc atg gcc 96  
 Arg Ala Ile Gly Arg Leu Ser Ser Leu Glu Asn Val Tyr Ile Met Ala  
 20 25 30  
 gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac 144  
 Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn  
 35 40 45  
 atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc 192  
 Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr  
 50 55 60  
 ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc 240  
 Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser  
 65 70 75 80  
 acc cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg 288  
 Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met  
 85 90 95  
 gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac 336  
 Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp  
 100 105 110  
 gag ctg tac aag ggc ggt acc gga ggg agc atg gtg agc aag ggc gag 384  
 Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Thr Gly Ser Met Val Ser Lys Gly Glu  
 115 120 125  
 gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac 432  
 Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp  
 130 135 140  
 gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gac gat gcc 480  
 Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala  
 145 150 155 160  
 acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg 528  
 Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu  
 165 170 175  
 ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ctg acc tac ggc gtg cag 576  
 Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln

180	185	190	
tgc ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc ttc aag			624
Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys			
195	200	205	
tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc aag			672
Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys			
210	215	220	
gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac			720
Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp			
225	230	235	240
acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag gag gac			768
Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp			
245	250	255	
ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac acg cgt gac caa ctg			816
Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Thr Arg Asp Gln Leu			
260	265	270	
act gaa gag cag atc gca gaa ttc aaa gaa gtc tcc cta ttt gac			864
Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp			
275	280	285	
aag gac ggg gat ggg aca ata aca acc aag gag ctg ggg acg gtg atg			912
Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met			
290	295	300	
cgg tct ctg ggg cag aac ccc aca gaa gca gag ctg cag gac atg atc			960
Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile			
305	310	315	320
aat gaa gta gat gcc gac ggt aat ggc aca atc gac ttc cct gaa ttc			1008
Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe			
325	330	335	
ctg aca atg atg gca aga aaa atg aac gac aca gac agt gaa gaa gaa			1056
Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu			
340	345	350	
att aga gaa gcg ttc cgt gtg ttt gat aag gat ggc aat ggc tac atc			1104
Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile			
355	360	365	
agt gca gca gag ctt cgc cac gtg atg aca aac ctt gga gag aag tta			1152
Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu			
370	375	380	
aca gat gaa gag gtt gat gaa atg atc agg gaa gca gac atc gat ggg			1200
Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly			
385	390	395	400
gat ggt cag gta aac tac gaa gag ttt gta caa atg atg aca gcg aag			1248
Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys			
405	410	415	
tga			1251
<210>; 5			
<211>;			
<212>; DNA			
<213>; Artificial Sequence			
<220>;			
<223>; Primer for myosin light chain kinase M13			

<;400>; 5	
ggcgttagccg ccaccatggg tacctcatca cgtcgtaagt ggaataagac	50
aggtaacgca gtcaga	66
<;210>; 6	
<;211>;	
<;212>; DNA	
<;213>; Artificial Sequence	
<;220>;	
<;223>; Primer for myosin light chain kinase M13	
<;400>; 6	
ggcgccgcctcaactagt tgagctcagc cgacctatag ctctgactgc	50
gtgacccgtc tt	62
<;210>; 7	
<;211>;	
<;212>; DNA	
<;213>; Artificial Sequence	
<;220>;	
<;223>; Primer for GFP	
<;400>; 7	
ggacgcgtac tagtaacgtc tatatcatgg ccgac	35
<;210>; 8	
<;211>;	
<;212>; DNA	
<;213>; Artificial Sequence	
<;220>;	
<;223>; Primer for GFP	
<;400>; 8	
ccggtaaccgc ccttgtacag ctcgtccatg cc	32
<;210>; 9	
<;211>;	
<;212>; DNA	
<;213>; Artificial Sequence	
<;220>;	
<;223>; Primer for GFP	
<;400>; 9	
gcggtaaccgg agggagcatg gtgagcaagg gcgaggag	38
<;210>; 10	
<;211>;	
<;212>; DNA	
<;213>; Artificial Sequence	
<;220>;	
<;223>; Primer for GFP	
<;400>; 10	
ggacgcgtcc cgttgtactc cagttgtgc cc	32
<;210>; 11	
<;211>;	

<212>; DNA  
 <213>; Artificial Sequence  
 <220>;  
 <223>; Primer for calmodulin  
 <400>; 11  
 ggacgcgtga ccaactgact gaagagcag  
 <210>; 12  
 <211>;  
 <212>; DNA  
 <213>; Artificial Sequence  
 <220>;  
 <223>; Primer for calmodulin  
 <400>; 12  
 gcgcggccgc tcacttcgct gtcatcattt gtac

29

34

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 GFP、改変GFP、および改変GFPを用いたカルシウムセンサー蛋白質の構造を模式的に示す図。

【図2】 カルシウムセンサー蛋白質（G3およびG85）の一次構造を示す図。

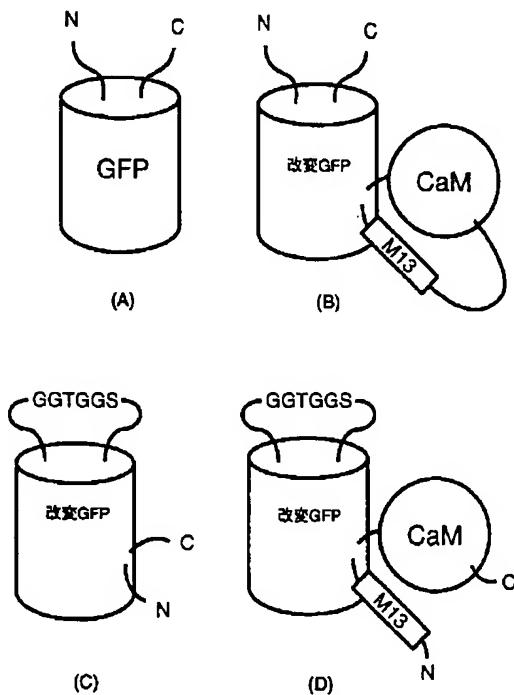
【図3】 ATPおよびカルバコールに対して、HEK293

細胞に発現したカルシウムセンサー蛋白質の蛍光量が変化する様子を示す図。

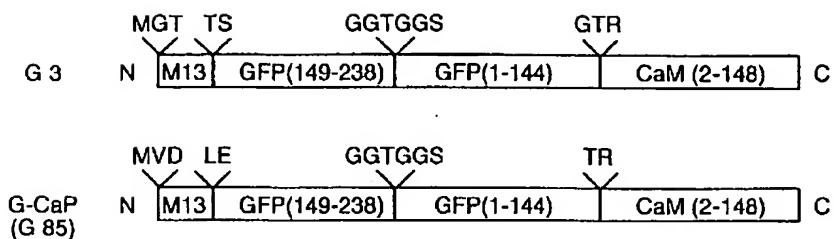
【図4】 カルバコールおよびカフェインに対して、骨格筋細胞に発現したカルシウムセンサー蛋白質の蛍光量が変化する様子を示す図。

【図5】 カルシウム濃度と蛍光量との関係を示すグラフ図。

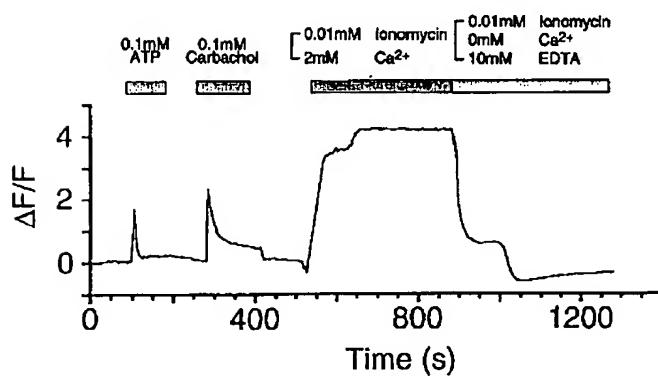
【図1】



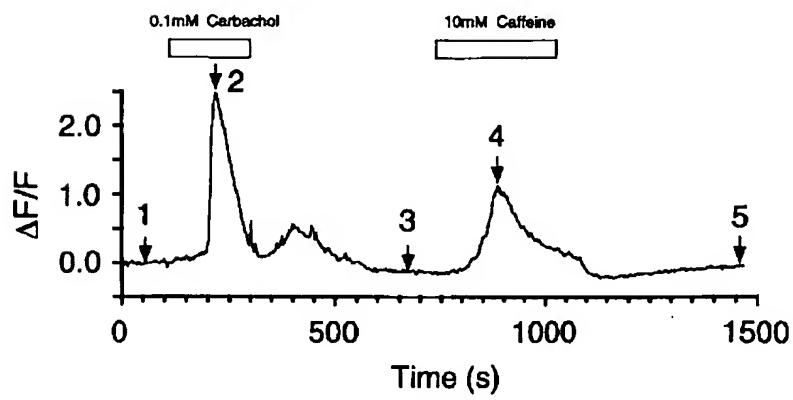
【図2】



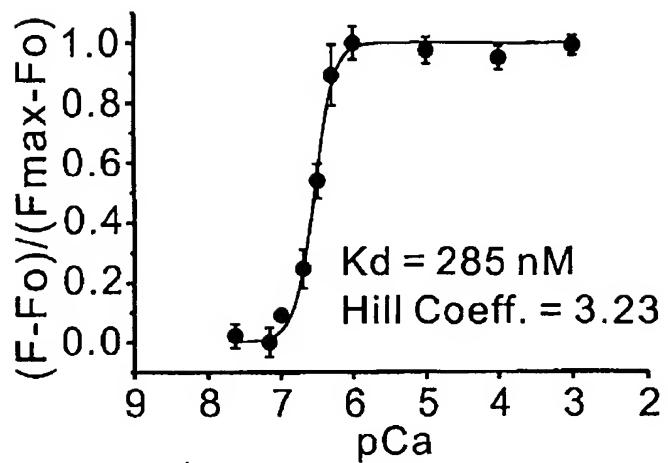
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	マコド' (参考)
C 0 7 K	14/47	C 0 7 K	
	19/00	19/00	
C 1 2 P	21/02	C 1 2 P	C
G 0 1 N	21/78	G 0 1 N	C
	33/53	33/53	D
	33/566	33/566	
//(C 1 2 P	21/02	(C 1 2 P	C
C 1 2 R	1:91)	21/02	
		C 1 2 R	1:91)
		C 1 2 N	Z N A A

F ターム(参考) 2G054 AA10 CA10 EA03 GA04 GA05  
 GB10  
 4B024 AA11 BA80 CA04 CA09 DA03  
 DA06 EA04 GA11 GA18 GA19  
 HA01  
 4B064 AG01 CA02 CA10 CA19 CC24  
 DA13  
 4H045 AA10 AA20 BA10 BA11 BA12  
 BA14 BA17 BA41 BA70 CA40  
 CA50 EA50 FA74